

**Directed mutagenesis of nucleic acid useful e.g. for codon optimization, comprises polymerization-ligation reaction of cloned fragment in presence of mutagenic oligonucleotide**

**Patent number:** FR2789696  
**Publication date:** 2000-08-18  
**Inventor:** DELCOURT MARC; BLES A STEPHANE  
**Applicant:** BIOMETHODES (FR)  
**Classification:**  
- international: C12Q1/68; C12N15/74; C07H21/00  
- european: C12N15/10B  
**Application number:** FR19990001719 19990212  
**Priority number(s):** FR19990001719 19990212

**Abstract of FR2789696**

Mutagenesis of a nucleic acid fragment (I) comprising cloning (I) into a vector, practically free of restriction enzyme (RE) cleavage sites, and circular polymerization-ligation of the vector with an oligonucleotide (ON) homologous with the region of (I) to be mutated, is new. ON introduces into (I) at least one required mutation and at least one screening mutation causing resistance to RE. Independent claims are also included for the following: (1) a vector for use in the novel process; (2) ON for use in the novel process; and (3) a kit for performing the novel process comprising a vector and optionally ON, buffer, heat-stable polymerase and ligase, deoxyribonucleotides and bacteria competent for transformation.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**



PROCÉDÉ DE MUTAGENESE D'UN FRAGMENT D'ACIDE  
NUCLÉIQUE PAR CLONAGE ET POLYMERISATION-LIGATION.

5           La présente invention concerne le domaine de la  
biologie moléculaire et se rapporte plus précisément à la  
mutagenèse dirigée de fragments d'ADN.

10           La mutagenèse dirigée de fragments d'ADN est un  
domaine en pleine expansion, qui permet d'étudier de façon  
très précise l'implication de chacun des résidus d'une  
protéine dans la ou les activités de celle-ci. En effet, en  
mutant successivement plusieurs résidus du fragments d'ADN  
qui pourra être transcrit en protéine, et en mesurant  
l'effet de chacune de ces mutations sur les activités de  
15           celle-ci, il est possible d'identifier les résidus  
intervenant dans chacune de ces activités.

20           Un autre champ d'application de la mutagenèse  
dirigée est celui de l'optimisation codonique, qui consiste  
à effectuer des mutations silencieuses, c'est à dire  
n'affectant pas la séquence en acides aminés de la protéine  
traduite à partir de cet ADN, mais permettant son  
expression dans de meilleures conditions dans un ou  
plusieurs hôtes d'expression. Ainsi, par exemple, les  
cellules de drosophiles, classiquement employées dans le  
cadre de l'expression de transgènes, n'utilisent pas  
25           préférentiellement les mêmes codons que les souches  
bactériennes pour traduire les ARNm en protéines. De même  
il est possible d'observer des différences dans  
l'utilisation des codons entre différentes souches  
30           bactériennes.

35           Différentes techniques de mutagenèse ont été  
décrites. La première utilisait le phage M13 sous ses  
différentes formes simple ou double brin (Higuchi, R et al,  
Nucleic Acid Research, 1988, Vol. 16, pages 7351 à 7367).

Cette technique, pour des raisons d'efficacité, a ensuite été remplacée par diverses technique utilisant la PCR, comme notamment celle des PCR chevauchantes (Ho, SN et al, Gene 1989, Vol. 77, pages 51 à 59). Cette dernière technique nécessite deux amplifications successives du fragment d'ADN à muter, séparées entre elles par des étapes de purification sur gel. Cette technique est donc devenue obsolète, en raison d'une part du trop grand nombre de cycles nécessaires (2x25 le plus souvent), qui constitue un facteur de mutations aléatoires dues au erreurs de copie des polymérases thermostables, et d'autre part au caractère toujours fastidieux de ladite technique car chaque mutations nécessite plusieurs jours de travail.

Récemment, différentes techniques faisant intervenir des réaction de polymérisation couplées à des réactions de ligation ont permis d'aboutir à des systèmes de mutagenèse plus efficaces, bien qu'encore imparfaits.

Ainsi, il a tout d'abord été proposé une méthode comprenant l'intégration d'un oligonucléotide muté lors d'une réaction de polymérisation-ligation en chaîne (Scott F. Michael, BioTechniques, 1994, Vol. 16, pages 410 à 412). Le produit obtenu, bien que contenant dans certains cas l'oligonucléotide muté, doit cependant être purifié sur gel et sous-cloné dans un vecteur pour pouvoir être utilisable, ce qui n'allège que peu le caractère fastidieux de la technique de mutagenèse initiale.

Une technique de réaction circulaire de polymérisation-ligation en chaîne a également été envisagée. Cette technique permet l'intégration de mutations lors de ladite réaction. Toutefois, cette technique ne prévoit pas de moyens de criblage pour les mutations n'affectant pas un site de restriction particulier (Chen Z, Nucleic Acid research, 1998, Vol. 26, pages 1126 et 1127), ce qui constituent la majorité des cas.

Enfin, une technique de répllication d'une molécule d'ADN circulaire permettant l'intégration d'oligonucléotides marqués a été commercialisée en 1998 par la société Promega (Système GeneEditor, catalogue 1999, chapitre 8, page 14). Ce système est basé sur l'utilisation d'une polymérase et d'une ligase thermosensible, ce qui ne rend possible qu'une seule répllication. Un procédé de double transformations dans des souches bactériennes particulières est ensuite utilisé pour récupérer les molécules d'ADN ayant intégré l'oligonuclétide muté, puis celles-ci sont sélectionnées sur un critère de modification de leur résistance à des antibiotiques, une seconde mutation affectant le gène de résistance aux antibiotiques du plasmide étant théoriquement associée à la mutation recherchée. Si cette technique allège le travail nécessaire à l'obtention d'une mutation d'un fragment d'ADN, certains points restent problématiques, comme la nécessité fastidieuse d'opérer deux transformations successives des molécules d'ADN à muter, l'impossibilité d'effectuer simultanément plusieurs mutations, ou encore comme la limitation actuelle du système aux vecteurs contenant un gène de résistance à l'ampicilline uniquement.

La présente invention se rapporte à une technique de mutagenèse dirigée ne présentant pas les inconvénients ci-dessus. Notamment, le procédé de l'invention est plus rapide et permet de s'affranchir d'étapes de purification sur gel ou de doubles transformations dans des souches bactériennes particulières.

Ce but est atteint selon l'invention grâce à procédé de mutagénèse d'un fragment d'acide nucléique, comme un fragment d'ADN, fondé sur les étapes suivantes :

a) le clonage dudit fragment dans un vecteur, comme un plasmide, substantiellement dépourvu de sites de clivage par les enzymes de restriction,

5 b) une réaction de polymérisation-ligation circulaire du vecteur obtenu à l'étape (a) en présence d'un ou plusieurs oligonucléotides substantiellement homologues à une région du fragment d'acide nucléique à muter, et permettant d'introduire les mutations suivantes au niveau du fragment d'acide nucléique à muter : (i) la ou les  
10 mutations recherchées et (ii) au moins une mutation induisant la résistance du vecteur contenant le fragment d'acide nucléique muté à une ou plusieurs enzymes de restriction pour le criblage desdits vecteurs, cette seconde mutation sera aussi désignée ci-après "mutation  
15 silencieuse de criblage".

Selon une forme de mise en œuvre préférée du procédé de l'invention, on utilise un seul oligonucléotide portant les mutations suivantes :

- 20 - au moins une mutation recherchée,  
- la mutation silencieuse de criblage.

Cette forme de mise en œuvre correspond au cas le plus fréquent où la mutation recherchée est voisine, c'est à dire distante de moins de 80 bases, d'un site de restriction unique, c'est-à-dire présent une seule fois sur  
25 l'ensemble constitué du fragment et du vecteur. Dans le cas où l'on souhaite introduire plusieurs mutations recherchées, et si les sites à muter sont proches, on peut utiliser un oligonucléotide qui contient une mutation  
30 silencieuse de criblage, et plusieurs mutations recherchées simultanément. Dans ce cas, il est aussi possible d'utiliser simultanément une série d'oligonucléotides jointifs, comportant chacun la ou les mutations désirées et/ou une ou plusieurs mutations silencieuses de criblage.

Selon une seconde forme de mise en œuvre du procédé de l'invention, on utilise deux oligonucléotides l'un portant la ou les mutations recherchées et l'autre la ou les mutations silencieuses de criblage. Cette forme de mise en œuvre correspond à un cas peu fréquent où la mutation à effectuer n'est pas située à proximité d'un site unique de restriction. Ces deux oligonucléotides, complémentaires de brins opposés, peuvent induire l'amplification du fragment d'ADN dont ils sont les bornes. La position d'hybridation de l'oligonucléotide contenant la mutation de criblage se situe préférentiellement au niveau d'un des sites uniques du fragment d'ADN inséré, mais peut également se situer au niveau d'un site unique encore présent sur le vecteur. Dans le cas où on souhaite obtenir simultanément plusieurs mutations recherchées trop éloignées pour pouvoir être contenues sur un seul oligonucléotide, on synthétise plusieurs oligonucléotides, chacun d'eux portant deux mutation : la première d'entre elles étant la mutation recherchée, la seconde étant la mutation silencieuse de criblage permettant de détruire un site enzymatique unique situé à proximité.

Le procédé de l'invention vise tout particulièrement le cas de l'introduction dans le fragment d'acide nucléique d'une seule mutation qui est voisine, c'est à dire distante de moins de 80 bases, d'un site de restriction unique. Toutefois, les caractéristiques du procédé de l'invention décrites ci-après visent également la mutagénèse d'un fragment d'acide nucléique consistant à introduire plusieurs mutations recherchées, et mettant en oeuvre un ou plusieurs oligonucléotides conformément aux deux modes de mise en œuvre indiquées ci-dessus.

Le procédé est remarquable en ce que l'oligonucléotide utilisé pour l'étape (b) est

substantiellement homologue à une région du fragment d'acide nucléique à muter tout en permettant d'introduire deux mutations :

(i) une première mutation qui est la mutation recherchée,

(ii) une seconde mutation silencieuse de criblage qui détruit un site de restriction unique présent sur le fragment d'ADN à muter et qui se situe à proximité du site de la première mutation, utile pour cribler les vecteurs ayant intégré ledit oligonucléotide et donc le fragment d'acide nucléique muté.

L'oligonucléotide est phosphorylé à son extrémité 5'.

On entend par substantiellement homologue, le fait que la séquence de l'oligonucléotide est suffisamment complémentaire d'une région du fragment d'acide nucléique pour permettre leur hybridation dans des conditions de stringence moyenne mais contient au moins les deux mutations indiquées ci-dessus.

De même, on entend par vecteur substantiellement dépourvu de sites de clivage par les enzymes de restriction, tout vecteur ne comportant aucun site de restriction hexanucléotidique ou un nombre réduit de tels sites, plus particulièrement, l'invention envisage un vecteur ne comprenant pas de site hexanucléotidique reconnu par plus de 50 enzymes de restriction disponibles dans le commerce (catalogue New England Biolabs Inc., 1999, chapitre 18).

Plus particulièrement, le procédé de l'invention comprend après les étapes (a) et (b), les étapes suivantes :

c) la digestion du produit de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne par une ou plusieurs enzyme de restriction correspondant à chaque mutation



silencieuse de criblage, c'est-à-dire l'enzyme de restriction dont le site est perdu lorsque l'oligonucléotide est intégré dans le vecteur ayant intégré le fragment d'acide nucléique à muter.

5 d) La transformation des produits de la digestion de l'étape (c) dans des bactéries compétentes, et le criblage desdites bactéries avec l'agent de sélection correspondant à un gène de résistance présent sur le vecteur.

10 e) La vérification par toutes méthodes connues de l'homme du métier que des bactéries possèdent la mutation introduite dans le fragment d'acide nucléique. De préférence, cette vérification est effectuée par minipréparation d'ADN plasmidique, par PCR sur colonies ou  
15 par séquençage.

Une représentation schématique du procédé de l'invention est donnée à la figure 1. Le procédé de l'invention est remarquable en ce que le pourcentage de  
20 molécules d'ADN ayant effectivement intégré la mutation recherchée, ainsi que la mutation servant au criblage, passe d'une fraction inférieure à 1/1000 avant le premier criblage de l'étape (c), à une fraction comprise entre 1/20 et 1/2 après.

25 Une forme détaillée de mise en œuvre du procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

a) On mélange :

30 - un vecteur substantiellement dépourvu de sites d'enzymes de restriction contenant le fragment d'ADN à muter,

- un oligonucléotide phosphorylé à son extrémité 5' substantiellement homologue à une région du fragment à muter, et comprenant deux mutations, une  
35 première mutation correspondant à la mutation recherchée,

et une seconde mutation silencieuse de criblage détruisant un site de restriction unique présent sur le fragment d'ADN à muter à proximité du site de la première mutation, utile pour cribler les vecteurs ayant intégré ledit oligonucléotide et donc le fragment d'acide nucléique muté.

- une polymérase thermostable,
- une ligase thermostable
- un tampon permettant l'activité de la polymérase et de la ligase thermostables,
- les quatre desoxy-nucléotides triphosphates.
- un ou plusieurs oligonucléotides complémentaires du vecteur et servant de relais pour une réaction d'amplification-ligation

b) on effectue une réaction de polymérisation en chaîne à l'aide d'un thermocycleur, dont les cycles sont constitués de trois paliers de températures :

- la température du premier palier est comprise entre 90 et 98 °C, et correspond à l'étape de dénaturation de l'ADN,

- la température du second palier est comprise entre 40 et 72 °C, de préférence 50 à 60 °C, et correspond à l'étape de liaison des oligonucléotides sur la matrice d'ADN que constitue le vecteur.

- la température de la troisième étape est comprise entre 65 et 75°C, et correspond à la phase d'élongation et de ligation des fragments d'ADN néosynthétisés. Avantagement le nombre de cycles de l'étape (b) est compris entre 2 et 100, de préférence 8 à 30.

c) On digère le produit de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne par l'enzyme de restriction correspondant à la mutation silencieuse de criblage, c'est-à-dire l'enzyme de restriction dont le site est perdu lorsque l'oligonucléotide est intégré dans le

vecteur ayant intégré le fragment d'acide nucléique nucléique à muter.

d) On transforme le produit de cette digestion dans des bactéries compétentes, et on laisse les bactéries pousser sur une boîte de petri contenant l'agent de sélection correspondant à un gène de résistance présent sur le vecteur.

e) On vérifie par toutes les méthodes connues de l'homme du métier, et préférentiellement par minipréparation d'ADN plasmidique, par PCR sur colonies ou par séquençage, que certaines des colonies bactériennes présentes sur la boîtes de petri de l'étape (d), possèdent la mutation introduite dans le fragment d'acide nucléique.

Des caractéristiques supplémentaires du procédé de l'invention et des moyens de sa mise en œuvre sont donnés ci-après.

1) Le vecteur.

Le vecteur utilisé à l'étape (a) du procédé de l'invention est avantageusement une molécule d'ADN circulaire, comme un plasmide, de taille comprise entre 1000 et 10000 paires de bases, et préférentiellement de 4000 à 6000. Outre une origine de répllication et un gène de résistance à un antibiotique, ledit vecteur contient un promoteur permettant l'expression d'un fragment d'ADN lorsque celui est inséré au niveau du polylinker. Le promoteur utilisé est préférentiellement versatile, de façon à ce qu'il puisse être actif dans un grand nombre de lignées ou tissus. A titre d'exemple, il peut s'agir du promoteur SRalpha. Le vecteur contient en outre un site de polyadénylation permettant, dans les cellules eucaryotes, l'expression stable d'ARNm à partir du fragment d'ADN inséré au niveau du polylinker.

La caractéristique principale de ce vecteur est qu'il est substantiellement dépourvu de sites de

restriction, c'est à dire que 50 à 100 des sites de restriction correspondant à des enzymes classiquement utilisées sont absents de ce vecteur. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré au niveau du polylinker de ce vecteur, certaines parmi lesdites enzymes de restriction possèdent un site unique au niveau de cet ensemble constitué du vecteur et du fragment cloné. En moyenne, on retrouve un tel site unique toutes les 80 bases environ lorsque le nombre d'enzymes est 53 et la taille de l'insert 1000 paires de bases.

## 2) L'oligonucléotide.

La mutagenèse réalisée à l'étape (b) du procédé de l'invention, met en oeuvre un oligonucléotide construit de façon à introduire la mutation dans le fragment d'ADN. Celui-ci possède les caractéristiques suivantes :

- Il est substantiellement complémentaire à un segment du fragment d'ADN à muter, ce segment est défini par la position à muter d'un côté et le plus proche site unique de restriction de l'autre. Avantagement, la taille de l'oligonucléotide dépasse ces deux positions de 5 à 50 bases, de préférence de 5 à 20 bases et tout préférentiellement de 9 bases.

- Il contient deux mutations, la première étant la position à muter, la seconde étant une des positions du site unique de restriction le plus proche de celle-ci, qui sera ainsi perdu.

- Il présente une taille comprise entre 10 et 1000 nucléotides.

Dans un premier exemple de mise en oeuvre, il est simple brin et sa taille est comprise entre 10 et 100 nucléotides. Il est dans ce cas préférentiellement obtenu par synthèse chimique.

Dans un second mode de mise en oeuvre, il est double brin, et sa taille est comprise entre 50 et 4000 nucléotides, de préférence 100 à 1000 nucléotide. Il aura

restriction, c'est à dire que 50 à 100 des sites de restriction correspondant à des enzymes classiquement utilisées sont absents de ce vecteur. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré au niveau du polylinker de ce vecteur, certaines parmi lesdites enzymes de restriction possèdent un site unique au niveau de cet ensemble constitué du vecteur et du fragment cloné. En moyenne, on retrouve un tel site unique toutes les 80 bases environ lorsque le nombre d'enzymes est 53 et la taille de l'insert 1000 paires de bases.

## 2) L'oligonucléotide.

La mutagenèse réalisée à l'étape (b) du procédé de l'invention, met en oeuvre un oligonucléotide construit de façon à introduire la mutation dans le fragment d'ADN. Celui-ci possède les caractéristiques suivantes :

- Il est substantiellement complémentaire à un segment du fragment d'ADN à muter, ce segment est défini par la position à muter d'un côté et le plus proche site unique de restriction de l'autre. Avantagusement, la taille de l'oligonucléotide dépasse ces deux positions de 5 à 50 bases, de préférence de 5 à 20 bases et tout préférentiellement de 9 bases.

- Il contient deux mutations, la première étant la position à muter, la seconde étant une des positions du site unique de restriction le plus proche de celle-ci, qui sera ainsi perdu.

- Il présente une taille comprise entre 10 et 1000 nucléotides.

Dans un premier exemple de mise en oeuvre, il est simple brin et sa taille est comprise entre 10 et 100 nucléotides. Il est dans ce cas préférentiellement obtenu par synthèse chimique.

Dans un second mode de mise en oeuvre, il est double brin, et sa taille est comprise entre 50 et 4000 nucléotides, de préférence 100 à 1000 nucléotide. Il aura

été obtenu par PCR à partir de deux oligonucléotides contenant pour l'un la mutation recherchée et pour l'autre la mutation silencieuse de criblage, et sera aussi désigné par la suite comme « mégaprimer ».

5                   - Il doit être phosphorylé en position 5'.

                  Une représentation schématique d'un vecteur contenant le fragment d'acide nucléique à muter, et l'oligonucléotide servant à effectuer la mutation, est donné à la figure 2. Dans cette figure, le fragment d'ADN, est représenté par le rectangle. Les barres verticales présentes dans le rectangle représentent les sites de restrictions présents une seule fois sur l'ensemble constitué du vecteur et du fragment d'ADN. L'oligonucléotide représenté au dessus du fragment d'ADN comporte deux mutations, l'une d'entre elles étant la mutation recherchée (celle de droite), l'autre, silencieuse, sert à abolir un site de restriction, ce qui permettra le criblage des fragments d'ADN ayant intégré l'oligonucléotide.

10

15

20

### 3) La réaction de polymérisation-ligation.

                  Le fragment d'acide nucléique à muter subit une réaction de polymérisation-ligation, effectuée au moyen d'une polymérase thermostable, d'une ligase thermostable et de l'oligonucléotide contenant les deux mutations décrit ci-dessus. Cette réaction se fait en outre en présence d'oligonucléotides complémentaires de différentes régions du vecteur ayant fonction de relais, d'un tampon permettant l'activité des deux enzymes, et de désoxy-nucléotides triphosphates. Un contrôle négatif peut être réalisé, contenant la totalité des éléments à l'exception de l'oligonucléotide contenant les deux mutations.

25

30

                  Ce mélange de polymérisation-ligation est soumis à une série de cycles de températures. Le premier palier de température est réalisé à 94°C environ, pendant 1

35

minute environ, et a pour vocation de dénaturer les molécules d'ADN hybridées entre elles. Le second palier est réalisé à une température comprise entre 40 et 72°C, de préférence 50 à 60°C, pendant 1 minute environ, et a pour vocation de permettre l'hybridation des différents oligonucléotides sur la matrice d'ADN constituée de chacun des brins du vecteur contenant le fragment à muter. Le troisième palier a lieu à une température comprise entre 65 et 75 °C pendant 1 à 10 minutes, de préférence 4, et a pour objet de permettre l'amplification à partir des oligonucléotides, et la liaison des fragments amplifiés lorsque l'extrémité 3' de l'un a rejoint l'extrémité phosphorylée 5' du suivant. Le nombre de cycles à effectuer est compris entre un minimum de deux et un maximum de 100 cycles, et est préférentiellement voisin de 10.

#### 4) Le premier criblage des molécules circulaires ayant intégré l'oligonucléotide muté.

Une première étape de criblage est très utile car moins d'une molécule d'ADN sur 1000 est généralement porteuse de la mutation recherchée à l'issue de la réaction de polymérisation-ligation. Cette première étape de criblage permet de cliver la majorité des vecteurs n'ayant pas intégré l'oligonucléotide muté, de façon à les rendre inaptes à être transformées dans des bactéries.

Le mélange obtenu à l'issue de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne est soumis à une digestion au moyen de l'enzyme dont le site unique sur le fragment d'ADN à muter est détruit lorsque l'oligonucléotide contenant les deux mutations est intégré dans la séquence. Cette enzyme de restriction, différente d'une expérience de mutagenèse à une autre, sera référée dans la suite comme "enzyme de criblage."

Pour ce faire, une fraction du mélange de réaction, 10 µl dans les exemples de réalisation, sont

prélevés à l'issue des cycles de température, et soumis à une réaction en présence de 2 µl de l'enzyme de restriction utilisée pour le criblage, de 2 µl de son tampon 10X, et de 6 µl d'eau, pendant une durée d'au moins une heure. En parallèle, la réaction contenant le contrôle négatif est également soumis à cette étape de digestion dans les mêmes conditions.

5) L'amplification des molécules circulaires obtenues après le premier criblage.

Les produits obtenus à l'issue du premier criblage sont transformés dans des bactéries compétentes, de façon à ce que certaines des molécules présentes dans le mélange soient amplifiées et récupérés en quantité suffisante pour pouvoir être analysées. Les bactéries compétentes ainsi transformées sont ensuite étalées sur une boîte de petri contenant l'antibiotique permettant de sélectionner les bactéries ayant intégré le vecteur contenant le fragment d'ADN muté ou non. Les boîtes de petri sont incubées à 37°C pendant une durée minimale de 12 heures.

Le nombre de colonies obtenues par transformation du mélange correspondant à la réaction en présence de l'oligonucléotide contenant les deux mutations est généralement 2 à 10 fois supérieur à celui obtenu dans le contrôle négatif, en l'absence dudit oligonucléotide.

6) Le second criblage.

Un second criblage est effectué pour but de sélectionner une ou plusieurs colonies contenant le fragment d'ADN effectivement muté. Pour ce faire, une ou plusieurs colonies bactériennes sont individuellement examinées pour leur sensibilité à l'enzyme de restriction de criblage. Différentes possibilités existent. Parmi celles-ci, deux techniques sont classiquement employées.



- La PCR sur colonies.

Cette technique repose sur l'amplification d'un segment contenant la position à muter, en utilisant des oligonucléotides de sens opposé situés de part et d'autre de celle-ci. Cette réaction peut être effectuée directement à partir de la colonie bactérienne, qui sera lysée lors de la réaction de PCR et dont l'ADN plasmidique, constitué du fragment effectivement muté ou non, constituera la matrice. Les produits amplifiés à partir de chacune des colonies sont ensuite soumis à une digestion par l'enzyme de restriction ayant déjà servi au premier criblage, et les colonies correspondant à des produits résistants à un tel clivage sont sélectionnées comme ayant intégré l'oligonucléotide à muter. La présence de la mutation recherchée est ensuite vérifiée par séquençage.

- La minipréparation d'ADN plasmidique et la digestion.

Les colonies obtenues peuvent être amplifiées par culture en milieu liquide, et l'ADN plasmidique en est extrait par minipréparation classique d'ADN. Les préparations plasmidiques obtenues sont ensuite testées pour leur sensibilité à l'enzyme de criblage. Les colonies correspondant à des produits résistants à un tel clivage sont sélectionnées comme ayant intégré l'oligonucléotide à muter. La présence de la mutation recherchée est ensuite vérifiée par séquençage.

Le pourcentage de colonies bactériennes contenant effectivement la mutation recherchée est généralement compris entre 5 et 50%.

L'invention concerne aussi un kit pour la mise en œuvre du procédé décrit précédemment.

Un tel kit comprend :

- un vecteur, clivé ou non au niveau de son polylinker, substantiellement dépourvu d'enzymes de

restriction, et contenant un promoteur permettant l'expression, dans les cellules eucaryotes, des fragments d'ADN clonés au niveau de son polylinker;

- éventuellement des oligonucléotides nécessaires en tant que relais pour que la réaction de polymérisation-ligation (PLCR) se fasse;

- éventuellement un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable. Ce tampon est par exemple composé d'un mélange à concentrations égales de tampon correspondant à la polymérase thermostable et de celui correspondant à la ligase thermostable;

- éventuellement une polymérase thermostable par exemple la Taq polymérase;

- une ligase thermostable par exemple la Tth ligase;

- éventuellement une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides;

- éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent concernant quatre formes de mise en œuvre du procédé de mutagénèse d'un fragment d'ADN inséré dans le vecteur pBM.1. pBM.1 est un vecteur substantiellement dépourvu de sites de clivage par 53 enzymes de restriction classiquement commercialisées, et possédant le promoteur SRalpha, qui un promoteur permettant d'exprimer des transgènes dans de nombreux tissus et lignées (Takebe Y et al, Mol. Cell. Biol., 1988, Vol. 8, pages 466 à 472).

#### Exemple 1 : Cas d'une mutagenèse simple.

Cet exemple concerne le cas, le plus fréquent, où la mutation recherchée est voisine, c'est à dire distante de moins de 80 bases, d'un site de restriction unique, c'est-à-dire présent une seule fois sur l'ensemble fragment et vecteur. Le fait que le vecteur ait été substantiellement débarrassé de ses sites de restriction implique que la majorité des sites de restriction présents sur le fragment d'ADN inséré dans le polylinker sera utilisable dans le cadre de cet exemple. En pratique, la distance moyenne entre deux sites uniques de restriction est suffisamment faible pour que plus de 98% des nucléotides dudit fragment d'ADN soient distants de moins de 80 bases d'un de ces sites uniques.

Dans une premier mode de réalisation, le fragment d'ADN intégré dans le vecteur est le gène eGFP. Un oligonucléotide 29mer phosphorylé en 5' correspondant aux positions 663 à 691 de ce gène a été synthétisé. Cet oligonucléotide, appelé eGFPAvaII, est identique à la séquence de la GFP à l'exception de deux positions : en position 20, la thymidine originale a été remplacée par une cytosine. Cette modification correspond à la mutation recherchée. En position 11, une cytosine a été remplacée par une thymidine, détruisant ainsi le site AvaII présent à cet endroit (et à nul autre ni sur le fragment d'ADN inséré ni sur le vecteur pBM.1). Cette enzyme AvaII sera utilisée dans cet exemple pour le criblage des mutants. La séquence de cet oligonucléotide est la suivante :

TCACATGGTCTTGCTGGAGCTCGTGACCG,

Les deux positions soulignées indiquent les nucléotides mutés par rapport à la séquence originale de la eGFP.

Le plasmide contenant le gène de la eGFP a été soumis à une réaction en chaîne de polymérase-ligase pendant 10 cycles de température organisés de la façon

suivante : 94°C : 1 minute. 50°C : 1 minute. 72°C : 4 minutes.

Le mélange de réaction était constitué de la façon suivante :

5	pBM.1 - eGFP (100 ng)	1 µl
	Oligo eGFPavaII (2 pMoles)	1 µl
	Taq Polymérase (5 U)	0,5µl
	Tth ligase (40 U)	0,5 µl
	Tampon 10X Taq Pol	1,25 µl
10	Tampon 5X Tth Ligase	2,5 µl
	Mélange de relais 12 x 15pMoles	2 µl
	Eau désionisée	16,25 µl
	Total	25 µl

15 En parallèle avec cette réaction, une réaction ne différant que par l'absence de l'oligonucléotide eGFPavaII a été menée.

20 A l'issue des cycles de température, 10 µl de chacune des deux réactions étaient prélevés, et soumis à la digestion pendant deux heures par l'enzyme de restriction AvaII, dans des conditions compatibles avec l'activité de cette enzyme. Le produit de digestion était ensuite transformé dans des bactéries compétentes de souche DH10bêta, et étalé sur une boîte de pétri.

25 Après une incubation de 12 heures, le nombre de colonies observées était d'environ 1000 sur la boîte de pétri correspondant à la réaction totale, contre environ 100 colonies seulement sur la boîte de pétri correspondant au contrôle négatif sans l'oligonucléotide eGFPavaII.

30 95 des 1000 colonies ont été ensuite testées par la technique de PCR sur colonies en utilisant des oligonucléotides flanquant le gène eGFP. Les produits d'amplification étaient résistant au clivage par l'enzyme AvaII dans environ 47% des cas. Parmi les produits  
35 d'amplification résistant au clivage par l'enzyme AvaII,

95% possédaient la mutation recherchée, en position 20 de l'oligonucléotide.

### Exemple 2 : Utilisation d'un "mégaprimer".

5

Cet exemple correspond à une situation peu fréquente où la mutation à effectuer n'est pas située à proximité d'un site unique de restriction. Il est alors nécessaire d'utiliser deux oligonucléotides phosphorylés d'environ 20 bases, le premier possédant la mutation d'intérêt, et le second induisant, lorsqu'intégré, la résistance à l'enzyme de criblage. Ces deux oligonucléotides, complémentaires de brins opposés, peuvent induire l'amplification du fragment d'ADN dont ils sont les bornes. La position d'hybridation de l'oligonucléotide contenant la mutation de criblage se situe préférentiellement au niveau d'un des sites uniques du fragment d'ADN inséré, mais peut également se situer au niveau d'un site unique encore présent sur le vecteur.

20

Dans un premier temps, une réaction classique d'amplification de 10 à 25 cycles dans des conditions standard est effectuée, composée de la façon suivante :

	pBM.1 - eGFP(100ng)	1 µl
25	oligo Mutation (20 pM)	1 µl
	Oligo Criblage (20 pM)	1 µl
	Tampon Taq pol 10 x	2 µl
	Taq Pol (5U)	1 µl
	Eau désionisée	14 µl
30	Total	20 µl

A l'issue de cette amplification, des produits sont ajoutés, et le nouveau mélange subit à nouveau une série de 10 cycles dans les conditions de l'exemple 1 :

	Mélange précédent	20 µl
35	Tth Ligase (40 U)	0,5 µl

Tampon Tth ligase 5 X	2,5 µl
Mélange de relais 12 x 15pMoles	2 µl
Total	25 µl

A l'issue de ces 10 cycles, 10 µl du mélange sont prélevés et digérés par l'enzyme de criblage dans ses conditions optimales pendant deux heures. La suite de cet exemple est similaire à l'exemple 1, car il s'agit de cribler les molécules ayant effectivement intégré la mutation en transformant le mélange de digestion enzymatique dans des compétentes, et en analysant séparément les colonies obtenues en utilisant l'enzyme de criblage.

### Exemple 3 : Cas d'une mutagenèse multiple.

Dans une troisième mode de réalisation, on désire effectuer plusieurs mutations simultanées situées en différents sites du même fragment d'ADN inséré dans le plasmide pBM.1.

Dans le cas où les sites à muter sont proches, on peut utiliser un oligonucléotide qui contient une mutation silencieuse de criblage, et plusieurs mutations recherchées simultanément. La démarche suivie est alors la même que dans l'exemple 1.

Dans le cas où on cherche à obtenir simultanément plusieurs mutations trop éloignées pour pouvoir être contenues sur un seul oligonucléotide, on synthétise plusieurs oligonucléotides, chacun d'eux portant deux mutation : la première d'entre elles étant la mutation recherchée, la seconde étant la mutation détruisant un site enzymatique unique situé à proximité. Alternativement, les oligonucléotides peuvent être des mégaprimers semblables à ceux décrits dans l'exemple 2.

Le processus se déroule comme dans le cas des exemples 1 ou 2, selon que le ou les oligonucléotides de

courts produits simple-brin issus de synthèse chimique ou, au contraire, des mégaprimers, à deux exceptions près : premièrement, toutes les enzymes de criblage doivent être utilisées sensiblement simultanément lors de la première  
5 étape de criblage, pour éliminer les fragments n'ayant pas intégré l'ensemble des mutations. Deuxièmement, les colonies bactériennes doivent être sélectionnées séparément pour l'absence de chacun des sites de restriction concernés, et pour la présence de chacune des mutations projetées.

10

Exemple 4 : Application du procédé de l'invention à l'optimisation codonique.

Cet exemple vise le cas où l'on souhaite faire  
15 un très grand nombre de mutations sur un même fragment d'ADN. Le cas le plus fréquent est lorsqu'on désire faire une optimisation des codons en vue de l'expression du fragment d'ADN dans tel ou tel système d'expression. Ainsi, pour une même séquence en acides aminés, les codons  
20 permettant une bonne expression de la protéine dans un système d'expression sont-ils différents.

Dans ce cas, il est possible d'utiliser simultanément une série d'oligonucléotides phosphorylés et jointifs, comportant chacun la ou les mutations désirées  
25 et/ou une ou plusieurs mutations permettant le criblage des fragments d'ADN ayant intégré ces oligonucléotides.

Le protocole est sensiblement semblable à celui décrit dans l'exemple 1, si tant est qu'une batterie d'enzymes de restrictions peuvent être utilisées  
30 sensiblement simultanément pour le criblage, et que les fragments d'ADN mutés retenus à la fin du processus devront être intégralement séquencés pour vérifier que la totalité des mutations ont bien été introduites.

35

## REVENDICATIONS

1) Procédé de mutagenèse d'un fragment d'acide  
nucléique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes  
5 suivantes :

a) le clonage dudit fragment dans un vecteur,  
substantiellement dépourvu de sites de clivage par les  
enzymes de restriction,

b) une réaction de polymérisation-ligation  
10 circulaire du vecteur obtenu à l'étape (a) en présence d'un  
ou plusieurs oligonucléotides substantiellement homologues  
à une région du fragment d'acide nucléique à muter, et  
permettant d'introduire les mutations suivantes au niveau  
du fragment d'acide nucléique à muter :

15 (i) la ou les mutations recherchées, et  
(ii) au moins une mutation de criblage  
induisant la résistance du vecteur contenant le fragment  
d'acide nucléique muté à une ou plusieurs enzymes de  
restriction pour son criblage.

20 2) Procédé selon la revendication 1,  
caractérisé en ce que à l'étape (b) on utilise un ou  
plusieurs oligonucléotides portant chacun les mutations  
suivantes :

25 - au moins une mutation recherchée,  
- une mutation de criblage.

30 3) Procédé selon la revendication 2,  
caractérisé en ce que à l'étape (b) on utilise plusieurs  
oligonucléotides jointifs.

35 4) Procédé selon la revendication 1,  
caractérisé en ce que à l'étape (b) on utilise deux  
oligonucléotides l'un portant la ou les mutations  
recherchées et l'autre la ou les mutations de criblage.



5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que à l'étape (b) on utilise deux oligonucléotides complémentaires de brins opposés du vecteur.

5

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la mutation de criblage est une mutation qui détruit un site de restriction unique présent sur le fragment d'ADN à muter et qui se situe à proximité du site de la mutation recherchée.

10

7) Procédé de mutagénèse d'un fragment d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15

a) le clonage dudit fragment dans un vecteur, substantiellement dépourvu de sites de clivage par les enzymes de restriction,

20

b) une réaction de polymérisation-ligation circulaire du vecteur obtenu à l'étape (a) en présence d'un oligonucléotide substantiellement homologue à une région du fragment d'acide nucléique à muter, et permettant d'introduire les mutations suivantes au niveau du fragment d'acide nucléique à muter :

25

(i) une première mutation qui est la mutation recherchée,

30

(ii) une seconde mutation silencieuse de criblage qui détruit un site de restriction unique présent sur le fragment d'acide nucléique à muter et qui se situe à proximité du site de la première mutation, utile pour cribler les vecteurs ayant intégré ledit oligonucléotide et donc le fragment d'acide nucléique muté.

35

8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend après les étapes (a) et (b), les étapes suivants :

c) la digestion du produit de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne par une ou plusieurs enzyme de restriction correspondant à chaque mutation silencieuse de criblage,

5 d) La transformation des produits de la digestion de l'étape (c) dans des bactéries compétentes, et le criblage desdites bactéries avec l'agent de sélection correspondant à un gène de résistance présent sur le vecteur.

10 e) La vérification par toutes méthodes connues de l'homme du métier que des bactéries possèdent la mutation introduite dans le fragment d'acide nucléique. De préférence, cette vérification est effectuée par minipréparation d'ADN plasmidique, par PCR sur colonies ou  
15 par séquençage.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) On mélange :

20 - un vecteur substantiellement dépourvu de sites d'enzymes de restriction contenant le fragment d'ADN à muter,

- un oligonucléotide phosphorylé à son extrémité 5' substantiellement homologue à une région du  
25 fragment à muter, et comprenant deux mutations, une première mutation correspondant à la mutation recherchée, et une seconde mutation silencieuse de criblage détruisant un site de restriction unique présent sur le fragment d'ADN à muter à proximité du site de la première mutation, utile  
30 pour cribler les vecteurs ayant intégré ledit oligonucléotide et donc le fragment d'acide nucléique muté.

- une polymérase thermostable,

- une ligase thermostable

35 - un tampon permettant l'activité de la polymérase et de la ligase thermostables,

- les quatre desoxy-nucléotides triphosphates.
- un ou plusieurs oligonucléotides complémentaires du vecteur et servant de relais pour une réaction d'amplification-ligation

5                   b) on effectue une réaction de polymérisation en chaîne à l'aide d'un thermocycleur, dont les cycles sont constitués de trois paliers de températures :

10                   - la température du premier palier est comprise entre 90 et 98 °C, et correspond à l'étape de dénaturation de l'ADN,

                  - la température du second palier est comprise entre 40 et 72 °C, de préférence 50 à 60 °C, et correspond à l'étape de liaison des oligonucléotides sur la matrice d'ADN que constitue le vecteur.

15                   - la température de la troisième étape est comprise entre 65 et 75°C, et correspond à la phase d'élongation et de ligation des fragments d'ADN néosynthétisés. Avantagusement le nombre de cycles de l'étape (b) est compris entre 2 et 100, de préférence 8 à

20                   30.

                  c) On digère le produit de la réaction de polymérisation-ligation en chaîne par l'enzyme de restriction correspondant à la mutation silencieuse de criblage, c'est-à-dire l'enzyme de restriction dont le site

25                   est perdu lorsque l'oligonucléotide est intégré dans le vecteur ayant intégré le fragment d'acide nucléique nucléique à muter.

                  d) On transforme le produit de cette digestion dans des bactéries compétentes, et on laisse les bactéries

30                   pousser sur une boîte de petri contenant l'agent de sélection correspondant à un gène de résistance présent sur le vecteur.

                  e) On vérifie par toutes les méthodes connues de l'homme du métier, et préférentiellement par

35                   minipréparation d'ADN plasmidique, par PCR sur colonies ou

par séquençage, que certaines des colonies bactériennes présentes sur la boîtes de petri de l'étape (d), possèdent la mutation introduite dans le fragment d'acide nucléique.

5                   10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la réaction de polymérisation-ligation de l'étape (b) est effectuée au moyen :

- 10                   - d'une polymérase thermostable,
- d'une ligase thermostable,
- d'un ou plusieurs oligonucléotides permettant d'introduire au niveau du fragment d'acide nucléique à muter la ou les mutations recherchées et au moins une mutation de criblage induisant la résistance du vecteur
- 15                   contenant le fragment d'acide nucléique muté à une ou plusieurs enzymes de restriction pour son criblage,
- d'oligonucléotides complémentaires de différentes régions du vecteur ayant fonction de relais,
- d'un tampon permettant l'activité des deux
- 20                   enzymes,
- de désoxy-nucléotides triphosphates.

25                   11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la réaction de polymérisation-ligation de l'étape (b) comprend la série de cycles de températures suivants :

- le premier palier de température est réalisé à 94°C environ, pendant 1 minute environ,
- le second palier est réalisé à une
- 30                   température comprise entre 40 et 72°C, de préférence 50 à 60°C, pendant 1 minute environ,
- le troisième palier a lieu à une température comprise entre 65 et 75 °C pendant 1 à 10 minutes, de préférence 4 minutes,

et le nombre de cycles à effectuer est compris entre un minimum de deux et un maximum de 100 cycles, et est préférentiellement voisin de 10.

5                   12) Un vecteur pour être utilisé à l'étape (a) d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une molécule d'ADN circulaire, comme un plasmide, de taille comprise entre 1000 et 10000 paires de bases, et préférentiellement  
10 de 4000 à 6000, substantiellement dépourvue de sites de restriction, et comprenant :

- une origine de réplication,
- un gène de résistance à un antibiotique,
- un promoteur permettant l'expression d'un

15 fragment d'ADN lorsque celui est inséré au niveau du polylinker.

13) Un vecteur selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il ne comprend pas les 50 à 100 sites  
20 de restriction correspondant aux enzymes classiquement utilisées.

14) Un oligonucléotide pour être utilisé à l'étape (b) d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il présente les caractéristiques suivantes

25

- Il est substantiellement complémentaire d'un segment du fragment d'ADN à muter, ce segment étant défini par la position à muter d'un côté et le plus proche site unique de restriction de l'autre, la taille dudit oligonucléotide dépasse ces deux positions de 5 à 50 bases, de préférence de 5 à 20 bases et tout préférentiellement de 9 bases.

30

- Il contient deux mutations, la première étant la position à muter, la seconde étant une des positions du

35

site unique de restriction le plus proche de celle-ci, qui sera ainsi perdu.

- Il présente une taille comprise entre 10 et 1000 nucléotides.

5 - Il doit être phosphorylé en position 5'.

15) Un oligonucléotide selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est simple brin et sa taille est comprise entre 10 et 100 nucléotides.

10

16) Un oligonucléotide selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est double brin, et sa taille est comprise entre 50 et 4000 nucléotides, de préférence 100 à 1000 nucléotides.

15

17) Un kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend

20 - un vecteur, clivé ou non au niveau de son polylinker, substantiellement dépourvu d'enzymes de restriction, et contenant un promoteur permettant l'expression, dans les cellules eucaryotes, des fragments d'ADN clonés au niveau de son polylinker;

25 - éventuellement des oligonucléotides nécessaires en tant que relais pour que la réaction de polymérisation-ligation se fasse;

30 - éventuellement un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable. Ce tampon est par exemple composé d'un mélange à concentrations égales de tampon correspondant à la polymérase thermostable et de celui correspondant à la ligase thermostable;

- éventuellement une polymérase thermostable par exemple la Taq polymérase;

- une ligase thermostable par exemple la Tth ligase;

- éventuellement une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides;

5           - éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

Fig.1

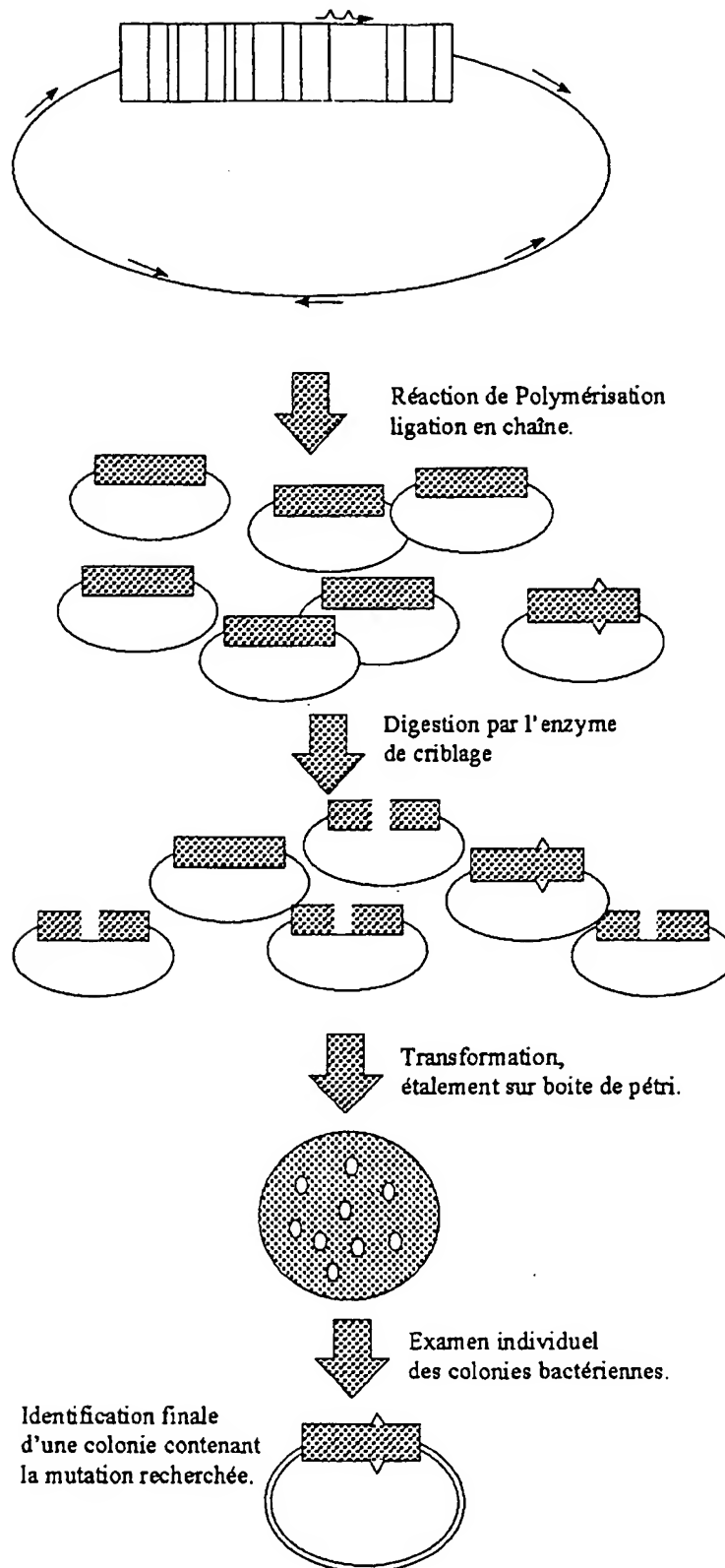
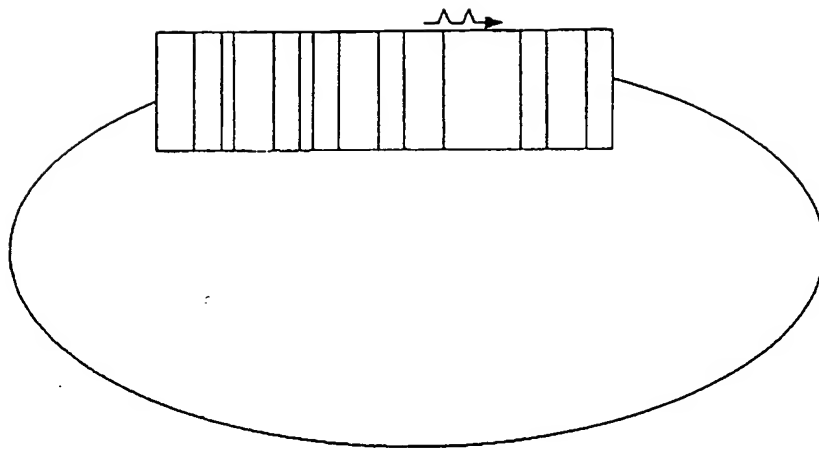




Fig.2



RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 571696  
FR 9901719

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 93 01282 A (BERLEX LAB) 21 janvier 1993 (1993-01-21) * le document en entier *	1
X	DENG W P & NIKOLOFF J A: "Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 200, 1 janvier 1992 (1992-01-01), pages 81-88, XP002096494 ISSN: 0003-2697 * le document en entier *	1,4
D,Y	CHEN Z, ET AL. : "Amplification of closed circular DNA in vitro." NUCLEIC ACIDS RES. , vol. 26, no. 23, 1 décembre 1998 (1998-12-01), pages 1126-1127, XP002122693 * le document en entier *	1
Y	WO 98 02537 A (PROMEGA CORP) 22 janvier 1998 (1998-01-22) * le document en entier *	1
Y	WO 93 13216 A (HARVARD COLLEGE) 8 juillet 1993 (1993-07-08) * le document en entier *	1
Y,D	CATALOGUE PROMEGA: "GeneEditor TM In vitro site-directed mutagenesis system" SYSTÈME GENEEDITOR, 1999, page 8.14 XP002122694 * le document en entier *	1
-/--		
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
16 novembre 1999		Chambonnet, F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 571696  
FR 9901719

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 97 46670 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY ; GIFFORD DAVID K (US)) 11 décembre 1997 (1997-12-11) * le document en entier *	1
A	JONES D H ET AL: "Production of a vector to facilitate DNA mutagenesis and recombination" BIOTECHNIQUES, vol. 4, no. 16, 1 janvier 1994 (1994-01-01), page 694 701 XP002076171 ISSN: 0736-6205 * le document en entier *	1
T	FR 2 772 048 A (BIOMETHODES) 11 juin 1999 (1999-06-11) * le document en entier *	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
16 novembre 1999		Chambonnet, F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**